

# 花药培养快速培育聚合抗3种水稻病害 基因的新种质研究

孙海波, 邹美智, 任洪岩, 王景余, 闫双勇, 李艳萍, 冯瑞光

(天津市农作物研究所, 天津 300384)

**摘要:**为培育抗水稻白叶枯病、稻瘟病、条纹叶枯病3种病害的品种,保证水稻的稳产高产,利用花药培养与常规育种技术、分子标记辅助选择技术相结合,进行聚合抗3种病害的新种质研究。结果表明,用含有抗白叶枯病 *Xa23* 基因的 BG152 和含有抗稻瘟病 *Pi-1* 基因的 R118 分别与含抗条纹叶枯病 *Stb-i* 基因的花育 409 进行有性杂交,共获得聚合双抗抗病基因的  $F_0$  种子分别为 180,105 粒;鉴别真杂种后彼此再杂交,获得复交  $F_0$  种子 1 398 粒。利用分子标记辅助选择技术,筛选出聚合抗3种病基因的杂合型单株 52 株,从中选择田间无病害的进行花药培养,经  $H_0$  自然加倍,获得双倍体花培植株 378 株。经 PCR 检测,筛选出聚合3种抗病基因的花培  $H_1$  株系 14 个;对其  $H_2$  植株进行重复 PCR 与抗病鉴定,获得聚合3种抗病基因的花培材料所含的抗病基因能稳定遗传,抗病性鉴定有 10 份均表现为抗(R),且高效表达抗病。最后对水稻花药培养中存在的问题进行了分析,并提出了相应防治措施。

**关键词:**水稻;分子标记辅助选择;花药培养;基因聚合;抗病

**中图分类号:**S511.03;S435 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)02-0116-08

**doi:**10.7668/hbxb.2015.02.021

## Study of Quick Cultivation of New Seeds with Three Diseases Resistance by Anther Culture Method

SUN Hai-bo, ZOU Mei-zhi, REN Hong-yan, WANG Jing-yu, YAN Shuang-yong,  
LI Yan-ping, FENG Rui-guang

(Tianjin Crops Research Institute, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** In order to breeding disease-resistant rice varieties to ensure stable and high-yields of rice, the breeding of disease-resistant germplasm was studied by methods of conventional, anther culture and molecular marker-assisted technology. The results showed that, after the gene *Stb-i* resistant to stripe disease was hybridized by BG152 of bacterial leaf blight resistant gene *Xa23* and R118 of rice blast resistant gene *Pi-1* respectively, 180 and 105 the seeds  $F_0$  with double resistant disease gene were obtained. Those seeds were re-crossed after identification of the true ones and 1 398  $F_0$  hybrids were screened. 52 single plants with disease resistant to three genes were obtained by molecular marker-assisted technology. Furthermore, 378 plants with double anther-culture were gotten based on the selection and culture of no disease samples in field after  $H_0$  natural doubling. 14 strains of anther culture with three disease-resistant genes were obtained though the PCR detection. After multiple identification of PCR and disease resistance of their  $H_2$  plants, 10 new seeds with stabilized hereditary and high level expression were obtained. At last, the analysis of the problem during the course of rice anther culture was carried out and the prevention and corresponding actions were proposed also.

**Key words:** Rice; Marker-assisted selection; Anther culture; Gene pyramiding; Resistance

水稻是我国第一大粮食作物,常年种植面积占粮食作物的30%,产量占粮食总产量的40%<sup>[1]</sup>;我国有60%以上人口以稻米为主食,尤其是以粳米为

主食的城乡居民日益增多<sup>[2]</sup>。所以发展水稻生产,对解决我国粮食安全供给具有举足轻重的作用。

在水稻生产中,病害是水稻高产稳产的重要限

收稿日期:2014-12-08

基金项目:天津市应用基础研究计划一般项目(11JCYBC08900)

作者简介:孙海波(1976-),男,天津宝坻人,副研究员,硕士,主要从事遗传育种及食品科学研究。

制因子,其中白叶枯病(由病原黄单胞菌的变种 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) 引起的一种细菌性病害)、稻瘟病(由子囊菌 *Magnaporthe oryzae* 引起的一种真菌性病害)和条纹叶枯病(由灰飞虱 *Laodelphax striatellus* *Fallen.* 传播引起的一种病毒性病害),广泛发生在全国各个稻区,每年均有不同程度的发生,年发生面积约 500 万  $\text{hm}^2$ ,流行年份一般减产 10%~20%,重者高达 40%~50%,甚至绝收<sup>[3]</sup>。生产上主要采用化学农药控制水稻病害,但是过多使用农药不仅增加生产成本,而且易污染环境、杀伤害虫天敌、增大稻谷中农药残留问题。实践证明,利用优良的抗病性资源,通过多种基因聚合,培育和种植抗病水稻品种是控制水稻病害发生的最为经济且有效的手段<sup>[4]</sup>,不仅可以提高水稻产量,减轻病害造成的损失,还可以减少农药使用量,减轻环境污染,确保实现现代农业健康可持续发展。

本项研究利用花药培养与常规育种技术、分子标记辅助选择技术相结合,预期快速实现抗白叶枯病基因 *Xa23*、抗稻瘟病基因 *Pi-1* 与抗条纹叶枯病基因 *Stvb-i* 的聚合,并创造出—批聚合抗 3 种水稻病害基因的新种质资源,为水稻抗病育种提供物质基础和理论支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供体亲本为携带抗白叶枯病 *Xa23* 基因的粳型材料 BG152 和携带抗稻瘟病 *Pi-1* 基因的籼型材料 R118,由中国农业科学院作物科学研究所提供;受体亲本为携带抗条纹叶枯病 *Stvb-i* 基因的优质粳稻自育品种花育 409;以及创造出的含 3 个抗病基因 *Xa23*、*Pi-1* 与 *Stvb-i* 的聚合体。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种植方式 按划格方式稀播种,尤其是单交  $F_1$  及复交  $F_1$  群体,确定每一个体的具体位置,便于个体跟踪,苗期经 PCR 检测后,单本移栽,株行距为 16.7 cm × 20 cm。管理同一般大田。

1.2.2 有性杂交 采用人工剪颖去雄方法进行有性杂交,每个组合作 250~300 个穗子,每个穗子留 60~80 朵小花,预收 1 500~2 000 粒  $F_0$  种子。

1.2.3 PCR 检测 DNA 提取及引物合成:在苗期对多种抗病基因的聚合植株及花培植株,采用简易 SDS 抽提法<sup>[5]</sup> 提取单株水稻幼嫩叶片 DNA。按文献[6~8]设计与目的基因紧密连锁的分子标记。其中,与抗白叶枯病 *Xa23* 基因紧密连锁的 RM206 引物序列为 R:5'-CGTTCATCGATCCGTATGG-3'和

F:5'-CCCATGCGTTTAACTATTCT-3',该引物在亲本扩增出 147 bp 左右片段;与抗稻瘟病 *Pi-1* 基因紧密连锁的 MRG4766 引物序列为 R:5'-AAGTGGAGGCAGTTCACCAC-3'和 F:5'-ATTGCTGCAAAGTGGAGAC-3',该引物在亲本扩增出 229 bp 左右片段;与抗条纹叶枯病 *Stvb-i* 基因紧密连锁的 RM11-8 引物序列为 R:5'-CGCGGTTTGCAGTAGTTGC-3'和 F:5'-TAGCCATGCTCATGCGTCAT-3',该引物在亲本扩增出约 200 bp 左右片段。上述引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

PCR 扩增:反应体系 20  $\mu\text{L}$ ,包括 2  $\mu\text{L}$  10 × Buffer(含 20 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ ),10~30 ng 模板 DNA,0.2 mmol/L dNTP,正向和反向引物各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ,1 U *Taq* 酶,ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min,在 4 °C 保存。

电泳:每管 PCR 扩增产物加 2  $\mu\text{L}$  的溴酚蓝混匀,点入 8% 聚丙烯酰胺变性测序凝胶上电泳,EB 染色显带,记录结果并拍照。其中含有目的基因带型记为“+”,不含目的基因带型记为“-”。

1.2.4 花药培养 取材与预处理:在田间选取经 PCR 技术证明携带有目标基因且农艺性状好的无病植株,选取其剑叶与倒二叶的叶枕距为 5~10 cm 的主茎或一级分蘖的穗子,并保留上部的 2 片叶子。剥取的幼穗用 70% 酒精消毒之后,再用纱布包好,装入塑料袋中,扎紧把口,以防水分蒸发,放置于 7~9 °C 冰箱内,预处理 10~15 d。

培养基:愈伤诱导培养基: $\text{N}_6$  大量元素 + 0.5 mg/L NAA + MS 有机质 + MS 微量元素 + 2 mg/L 2,4-D + 0.8% 琼脂 + 5% 蔗糖;

分化培养基:MS + 1 mg/L NAA + 2 mg/L KT + 0.5 mg/L IAA + 1% 琼脂 + 3% 蔗糖;

生根培养基:1/2 MS + 0.2 mg/L IAA + 1% 琼脂 + 1.5% 蔗糖。

诱导与分化:接种前,选取单核靠边期的幼穗,进行 0.1%  $\text{HgCl}_2$  灭菌 10 min,用无菌水至少冲洗 4 次。采用剪颖抖花药法,于装有愈伤诱导培养基的 50 mL 三角瓶中,每瓶接种花药 100 枚左右;在温度为 26~28 °C、湿度为 50%~60% 条件下,进行诱导愈伤组织的暗培养。当愈伤组织直径达 1.5~2 mm 时,将其转至装有分化培养基试管中,每管转 3 块愈伤;在温度为 26~28 °C、湿度为 60% 条件下,进行分化绿苗的光培养。

壮苗:当分化绿苗长至 2~4 cm 高且有 2~3 片

叶子、根系发育良好时,及时把苗转入生根培养基上进行培养,当绿苗长至 10~15 cm 时,将苗取出进行炼苗。

鉴定倍性植株:花培绿苗单本移栽于大田,成熟期统计总苗数、单倍体数、二倍体数、多倍体数,计算二倍体得率。

数据统计方法:

出愈率 = 形成愈伤组织块数 / 接种花药数  $\times 100\%$ ;

分化率 = (分化绿苗愈伤组织块数 + 分化白苗愈伤组织块数) / 转移愈伤组织块数  $\times 100\%$ ;

绿苗分化率 = 分化绿苗愈伤组织块数 / 转移愈伤组织块数  $\times 100\%$ ;

绿苗产率 = 出愈率  $\times$  绿苗分化率  $\times 100\%$ 。

1.2.5 农艺性状考察 采用完全随机区组设计,3 次重复,单株插秧,每材料插 3 行,每行 9 穴。除去两端各 2 穴外,在中间行随机取 5 穴考种,调查播种期,计算株高、穴穗数、穗粒数、结实率、千粒质量、单株谷量等数据。

1.2.6 抗病鉴定 每份待鉴定材料同期播种、插秧,插 2 行区,每行 5 穴,每穴单株,株行距为 13.3 cm  $\times$  30 cm。田间管理同一般水田。

抗白叶枯病鉴定:采用人工剪叶法<sup>[9]</sup>在水稻分蘖盛期接种。所用白叶枯病菌为来源于我国的代表菌株 V5 和来自菲律宾的 P6 共 2 个菌株,分别由中国农业科学院作物科学研究所和天津农学院提供。每株接种 3 片剑叶。接种后 15 d 左右,当感病对照品种 IR24 不再发病时,调查并测量各植株的病斑长度占其叶片总长度的百分率。参考我国白叶枯病抗性分级标准<sup>[10]</sup>,按病斑长度百分率大小记录发病情况,分为 2 种抗病水平: $\leq 15\%$  为抗(R), $\geq 16\%$  为感病(S)。

抗稻瘟病鉴定:采用注射法<sup>[11]</sup>在水稻孕穗期注射接种。所用稻瘟病菌为天津市优势稳定生理小种 ZB17、ZC3、ZG1 混合菌株,由天津市植物保护研究

所提供。每株注射 1 mL,待感病品种丽江新团黑谷发病充分之后,采用目测法,参照文献[12]的病级标准:0 级,无病;1 级,接种穗子的 1/4 以下支梗发病或者穗颈部有斑点;2 级,接种穗子的 1/4 以上支梗发病或者主轴中部发病或者穗颈部发病,但对其产量的不良影响不大;3 级,接种穗子的主轴中部或穗颈部发病,对产量不良影响显著;4 级,接种穗子为白穗,调查各植株发病情况:0~2 级记为抗病(R),3~4 级记为感病(S)。

抗条纹叶枯病鉴定:采用田间自然鉴定法,选在天津市西青区(重病区)自然鉴定。7 月 15~31 日,待感病品种中作 93、武育梗 3 号发病充分后,调查条纹叶枯病发病情况。参照文献[13]的病级调查标准:0 级,无病;1 级,有轻微黄绿色斑,但病叶不卷曲,植株生长正常;2 级,病叶上褪绿扩展相连呈不规则黄绿色或黄白色条斑,但病叶不卷曲或略有卷曲,植株生长基本正常;3 级,病叶卷曲呈捻转状且严重褪绿,出现黄化枯萎症状;4 级,大部分病叶卷曲呈捻转状,叶片黄化枯死,植株呈假枯心状或整株枯死。其中,0 级记为不发病,1 级在 7 d 后再次调查后确定,2~4 级记为发病,计算发病率。按发病率分为 2 种抗病水平: $\leq 15\%$  为抗(R), $\geq 16\%$  为感病(S)。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗 3 种病害基因的聚合

用携带抗白叶枯病 *Xa23* 基因的中间材料 BG152 和携带抗稻瘟病 *Pi-1* 基因的中间材料 R118 作为供体分别与含抗条纹叶枯病 *Stvb-i* 基因的优质粳稻品种花育 409 进行有性杂交,获得聚合 2 种抗病基因的  $F_0$  种子 180,105 粒(表 1)。田间鉴别真假杂种后,将 2 个带有双抗抗病基因的真杂种,选择田间无病虫害的植株彼此杂交,获得聚合 3 种抗病基因的复交  $F_0$  种子 1 398 粒(表 2)。

表 1 双抗病基因聚合结果

Tab.1 The results of polymerization for double disease-resistant gene

组合 Cross	聚合双抗病基因 Double resistance gene	组合名称 Cross parents	获得的 $F_0$ 种子数/粒 The number of $F_0$ seeds obtained
组合 1 Cross 1	<i>Stvb-i/Xa23</i>	花育 409/BG152	180
组合 2 Cross 2	<i>Stvb-i/Pi-1</i>	花育 409/R118	105

表 2 三抗病基因聚合结果

Tab.2 The results of polymerization for triple disease-resistant gene

编号 Number	聚合三抗病基因 Triple resistance gene	组合名称 Cross parents	获得的 $F_0$ 种子数/粒 The number of $F_0$ seeds obtained
复交 1 Multiple cross 1	<i>Stvb-i/Xa23//Stvb-i/Pi-1</i>	组合 1/组合 2	720
复交 2 Multiple cross 2	<i>Stvb-i/Pi-1//Stvb-i/Xa23</i>	组合 2/组合 1	678
合计 Total			1 398

2.2 复交 F<sub>1</sub> 聚合体植株的 PCR 检测

按划格方式稀播复交 F<sub>1</sub> 群体,确定每一个体的具体位置,于 3 叶期对 901 株单株逐株取叶提取 DNA,采用与 3 种抗病基因紧密连锁的分子标记检测各个体的抗性基因,其结果见表 3。

从表 3 可以看出,该群体中 3 种抗病基因均呈现分离和自由组合。PCR 检测带有 1 种抗病基因的植株 226 株,占 25.09%,其中 *Xa23* 呈阳性的植

株有 56 株,占 6.22%;*Pi-1* 呈阳性的植株有 59 株,占 6.55%;*Stvb-i* 呈阳性的植株有 111 株,占 12.32%。获得聚合 2 种抗病基因的植株 540 株,占 59.93%,其中 *Xa23* 和 *Pi-1* 呈阳性的植株有 155 株,*Xa23* 和 *Stvb-i* 呈阳性的植株有 194 株,*Pi-1* 和 *Stvb-i* 呈阳性的植株有 191 株,分别占 17.20%,21.53%,21.20%。获得聚合 3 种抗病基因的植株 52 个,占 5.77%。

表 3 聚合 3 种抗病基因复交 F<sub>1</sub> 植株的 PCR 检测统计

Tab.3 The PCR statistics of detection for F<sub>1</sub> strains produced by polymerization of three disease resistant genes

复交 F <sub>1</sub> 群体 Complex F <sub>1</sub> populations	PCR 检测 PCR detection	
	阳性植株/株 Positive plant	所占比例/% Percentage
单抗病基因植株 Single resistance gene plant	226	25.09
双抗病基因聚合体 Double resistance gene plant	540	59.93
三抗病基因聚合体 Triple resistance gene plant	52	5.77
无抗病基因植株 No resistance gene plant	83	9.21
合计 Total	901	100.00

2.3 聚合体植株的花药培养

经 PCR 检测筛选出聚合抗 3 种病基因的复交 F<sub>1</sub> 单本移栽于大田,从 8 月 2 日开始到 8 月 29 日结束,陆续选取田间无病虫害的农艺性状好的单株的穗子,8 月 11 日开始接种。

2.3.1 愈伤组织诱导与分化 共计接种 20 700 枚花药,出愈伤 6 543 块,平均出愈率为 29.65%,转管 4 000 块,分化出苗 1 148 丛,其中绿苗 766 丛,白苗 382 丛,分化率为 28.70%(表 4、图 1,2)。

表 4 愈伤组织诱导率和分化率

Tab.4 The rates of callus induction and differentiation

组合 Cross	接种花药数 Inoculate number of anther	愈伤组织块数 Inoculated callus number	出愈率/% Ratio of callus induction	转管愈伤 组织块数 Gatling callus blocks	白苗 Albino plantlet	绿苗 Green plantlet	总苗数 Total plantlet	分化率/% Differential ratio	绿苗分 化率/% Ratio of green plantlet	绿苗产率/% Production of green plantlet
复交 1 Multiple cross 1	10 350	3 502	33.84	2 000	201	433	634	31.70	21.65	7.33
复交 2 Multiple cross 2	10 350	3 041	29.38	2 000	181	333	514	25.70	16.65	4.89
合计 Total	20 700	6 543	29.65	4 000	382	766	1 148	28.70	19.15	3.76



图 1 愈伤组织培养

Fig.1 Callus culture

2.3.2 花培植株 H<sub>0</sub> 自然加倍 从表 5 得出,766 株花培苗 H<sub>0</sub> 在海南自然加倍,获得二倍体 378 株,占 49.35%;单倍体 374 株,占 48.83%;多倍体 14 株,占 1.82%。



图 2 分化苗组织培养

Fig.2 Differentiation of seedling tissue culture

2.4 花培植株 H<sub>1</sub> 的 PCR 检测

对 378 份花培植株 H<sub>1</sub> 苗期提取 DNA,进行 PCR 检测。结果见表 6、图 3~5。从表 6 可以看出,378 份花培植株 H<sub>1</sub> 经 PCR 检测,获得带有一种抗病基因 H<sub>1</sub> 株系 172 个,占 42.35%,其中 *Xa23* 呈阳性的

H<sub>1</sub>株系有 45 个,占 11.90%;*Pi-1* 呈阳性的 H<sub>1</sub>株系有 55 个,占 14.55%;*Stvb-i* 呈阳性的 H<sub>1</sub>株系有 72 个,占 19.05%。获得聚合 2 种抗病基因 H<sub>1</sub>株系 127 个,占 33.60%,其中 *Xa23* 和 *Pi-1* 呈阳性的 H<sub>1</sub>株系有 32 个,*Xa23* 和 *Stvb-i* 呈阳性的 H<sub>1</sub>株系有 41 个,*Pi-1* 和 *Stvb-i* 呈阳性的 H<sub>1</sub>株系有 54 个,分别占 8.47%,10.85%,14.28%。获得聚合 3 种抗病基因的 H<sub>1</sub>株系 14 个,占 3.7%。

表 5 花培植株 H<sub>0</sub>自然加倍倍性调查结果

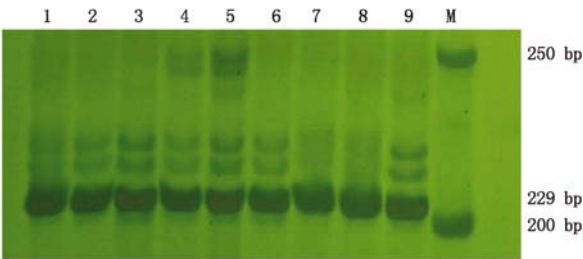
Tab.5 The survey results of natural double ploidy of anther plant H<sub>0</sub>

组合 Cross	总苗数/株 Total plantlet	单倍体 Haploid		二倍体 Diploid		多倍体 Polyploid	
		株 Plant	得率/% Percentage	株 Plant	得率/% Percentage	株 Plant	得率/% Percentage
复交 1 Multiple cross 1	433	204	47.11	221	51.04	8	1.85
复交 2 Multiple cross 2	333	170	51.05	157	47.15	6	1.80
合计 Total	766	374	48.83	378	49.35	14	1.82

表 6 花培植株 H<sub>1</sub> PCR 检测统计

Tab.6 The statistics of detection for H<sub>1</sub> PCR anther culture

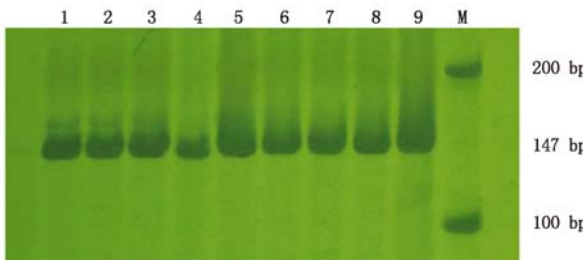
H <sub>1</sub> 株系 H <sub>1</sub> strain	抗病基因种类 Disease resist-gene	PCR 检测 PCR detection			
		阳性植株/株 Positive plant	合计/株 Totle	所占比例/% Percentage	合计/% Total
单抗病基因植株 Single resistance gene plant	<i>Xa23</i>	45	172	11.90	42.35
	<i>Pi-1</i>	55		14.55	
	<i>Stvb-i</i>	72		19.05	
双抗病基因聚合体 Double resistance gene plant	<i>Xa23</i> 、 <i>Pi-1</i>	32	127	8.47	33.60
	<i>Xa23</i> 、 <i>Stvb-i</i>	41		10.85	
	<i>Pi-1</i> 、 <i>Stvb-i</i>	54		14.28	
三抗病基因聚合体 Triple resistance gene plant	<i>Xa23</i> 、 <i>Pi-1</i> 、 <i>Stvb-i</i>	14	14	3.70	3.70
无抗病基因植株 No resistance gene plant		65	65	17.20	17.20
合计 Total		378	378	100.00	100.00



M. Marker DGL 2000;1. 阳性对照 R118;2~9. 含目的基因。  
M. Marker DGL 2000;1. Positive control plant R118;  
2~9. Plants having target gene.

图 3 *Pi-1* (229 bp) 的 PCR 检测结果

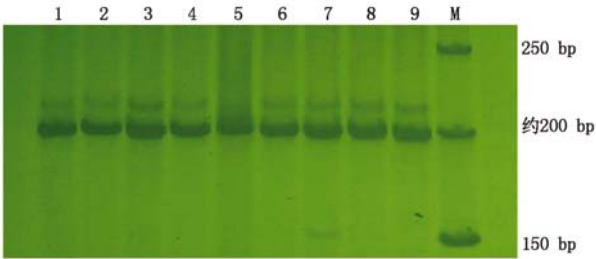
Fig.3 The results of PCR for *Pi-1* (229 bp)



M. Marker DGL 2000;1. 阳性对照 BG152;2~9. 含目的基因。  
M. Marker DGL 2000;1. Positive control plant BG152;  
2~9. Plants having target gene.

图 4 *Xa23* (147 bp) 的 PCR 检测结果

Fig.4 The results of PCR for *Xa23* (147 bp)



M. Marker DGL 2000;1. 阳性对照花育 409;2~9. 含目的基因。  
M. Marker DGL 2000;1. Positive control plant Huayu 409;  
2~9. Plants having target gene.

图 5 *Stvb-i* (约 200 bp) 的 PCR 检测结果

Fig.5 The results of PCR for *Stvb-i* (about 200 bp)

2.5 花培植株 H<sub>2</sub> PCR 检测及抗病鉴定

对 14 份聚合 3 种抗病基因的 H<sub>2</sub> 植株,苗期提取 DNA,进行 PCR 检测。移栽时分成 4 份,进行抗白叶枯病、条纹叶枯病、稻瘟病鉴定和农艺性状考察。PCR 检测及抗病鉴定结果见表 7。从表 7 可以看出,筛选出的 14 份聚合 3 种抗病基因的花培植株 H<sub>2</sub>,经 PCR 检测 3 种抗病基因均呈阳性;抗白叶枯病和抗条纹叶枯病鉴定,14 份供试材料表现抗病 (R),抗稻瘟病鉴定,10 份表现为抗病 (R),4 份表现为感病 (S)。

表 7 花培植株 H<sub>2</sub> PCR 与抗病鉴定结果

Tab.7 H<sub>2</sub> PCR detection of anther culture and identification of disease resistance

植株编号 Plant Ordinal	上代编号 Generation number	<i>Xa23</i>	抗白叶枯病鉴定 Identification of bacterial blight resistance	<i>Pi-1</i>	抗稻瘟病鉴定 Identification of rice blast resistance	<i>Stwb-i</i>	抗条纹叶枯病鉴定 Identification of resistance to stripe disease
H <sub>2</sub> -1	H <sub>1</sub> -7	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -2	H <sub>1</sub> -25	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -3	H <sub>1</sub> -62	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -4	H <sub>1</sub> -71	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -5	H <sub>1</sub> -99	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -6	H <sub>1</sub> -121	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -7	H <sub>1</sub> -141	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -8	H <sub>1</sub> -191	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -9	H <sub>1</sub> -226	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -10	H <sub>1</sub> -247	+	R	+	R	+	R
H <sub>2</sub> -11	H <sub>1</sub> -273	+	R	+	S	+	R
H <sub>2</sub> -12	H <sub>1</sub> -312	+	R	+	S	+	R
H <sub>2</sub> -13	H <sub>1</sub> -349	+	R	+	S	+	R
H <sub>2</sub> -14	H <sub>1</sub> -371	+	R	+	S	+	R
P-1	花育 409	-	S	-	S	+	R
P-2	R118	-	S	+	R	-	S
P-3	BG152	+	R	-	S	-	S

注：“+”. PCR 检测阳性；“-”. PCR 检测阴性；“S”. 感病；“R”. 抗病。  
Note：“+”. Represents positive；“-”. Represents negative；“S”. Represents infected；“R”. Represents disease-resistance.

2.6 花培植株 H<sub>2</sub> 农艺性状考察 14 份材料已纯合稳定。成熟后取样进行考种,其结果见表 8。

种植在水田的聚合抗病基因的 14 份花培植株 H<sub>2</sub>,每个株系田间表现农艺性状整齐一致,表明这

表 8 聚合 3 种抗病基因的花培植株 H<sub>2</sub> 农艺性状考察结果

Tab.8 Comparison of agronomic traits resistant lines

编号 Plant lines	抽穗期 /(月-日) Heading stage	株高/cm Plant height	每株穗数/个 Effective panic per plant	每株 穗长/cm Panicle length	穗粒数/粒 Total grains per plant	结实率/% Seed setting rate	千粒质量/g 1 000-grain weight	单株谷 质量/g Yield per plant	比 CK/± % Comparison with the control
H <sub>2</sub> -1	08-24	95.0	12.6	23.78	133.6	97.76	25.3	30.62	-0.20
H <sub>2</sub> -2	08-20	110.6	7.0	21.98	143.4	89.42	24.7	26.60	-13.30
H <sub>2</sub> -3	08-20	98.2	5.4	25.64	113.0	92.02	24.7	22.34	-27.18
H <sub>2</sub> -4	08-24	75.6	13.2	13.57	159.3	93.54	25.0	27.22	-11.28
H <sub>2</sub> -5	08-28	78.4	11.8	14.72	93.2	91.21	25.0	22.44	-26.86
H <sub>2</sub> -6	08-21	99.8	10.4	24.56	164.4	79.32	26.0	24.70	-19.49
H <sub>2</sub> -7	08-24	95.2	12.2	27.98	166.4	84.87	25.0	29.58	-3.59
H <sub>2</sub> -8	08-25	93.4	8.2	22.28	101.0	69.27	24.7	24.00	-21.77
H <sub>2</sub> -9	08-18	112.4	7.8	18.74	149.6	83.85	24.3	28.14	-8.28
H <sub>2</sub> -10	08-09	110.8	7.0	30.40	154.6	84.58	25.0	29.28	-4.56
H <sub>2</sub> -11	08-20	110.0	8.5	27.44	150.1	86.85	25.0	28.14	-8.28
H <sub>2</sub> -12	08-26	83.8	18.4	16.10	141.4	78.50	24.3	26.06	-15.06
H <sub>2</sub> -13	08-18	101.2	9.8	20.78	154.6	92.76	25.0	28.08	-8.47
H <sub>2</sub> -14	08-28	82.2	20.2	17.27	111.0	96.40	24.3	28.56	-6.91
CK	08-25	94.2	14.4	18.77	166.6	90.22	24.7	30.68	0

从表 8 看出,聚合 3 种抗病基因的花培材料各性状株系之间表现不同,存在差异。抽穗期为 8 月 9-28 日,均能正常成熟;株高为 75.6~112.4 cm,每株穗数为 5.4~20.2 个,穗长 13.57~30.40 cm,穗粒数 93.2~166.4 粒,结实率 69.27%~97.76%,千粒质量 24.3~26.0 g,单株谷质量为



22.34 ~ 30.62 g, 均比对照津原 45 产量低, 减幅为 0.20% ~ 27.18%。

### 3 讨论

#### 3.1 水稻花药培养与常规育种技术、分子标记辅助选择有机结合, 可快速创造出聚合抗多种病害基因且高效表达的粳稻种质资源

选择是水稻抗病育种的重要环节。传统的水稻抗病育种主要依赖于植株的表型进行选择, 而对抗病表型植株一般采用抗病鉴定直接选择的方法, 这不仅要求育种者要有丰富的选择经验, 而且还容易受环境影响, 造成鉴定结果表现不稳定, 使选择效率低, 选择周期长, 耗费大量人力物力。分子标记辅助选择是 Ribaut 等提出的一种植物改良的方法<sup>[14]</sup>。育种者只要找到与抗性基因紧密连锁的分子标记, 就可以选择出同时含有那些目的基因的单株, 并且无须在早世代进行抗病鉴定。

本研究用含有抗白叶枯病 *Xa23* 基因的中间材料和含有抗稻瘟病 *Pi-1* 基因的中间材料分别与含抗条纹叶枯病 *Stb-i* 基因的优质粳稻品种进行有性杂交, 获得聚合 2 种抗病基因, 再将 2 个带有 2 种抗病基因的真杂种彼此杂交, 获得聚合抗 3 种病害基因的复交  $F_0$  种子。按划格方式稀播复交  $F_1$  群体, 确定每一个体的具体位置, 于 3 叶期逐株取叶提取 DNA, 再采用与 3 种抗性基因紧密连锁的分子标记检测各个体的抗性基因型, 选择聚合了 3 种基因型的个体, 从中进一步选择农艺性状比较好的个体分别花培。花培一代自然加倍, 收获二倍体花培植株种子; 花培二代 ( $H_1$ ) 采用同样方法, 分子标记检测各个体 3 个抗性基因位点的基因型, 选择聚合了 3 种抗性基因花培个体, 并分单株收种。移栽时将花培聚合后代分成 4 份, 一份用于人工接种结合病区种植进行稻瘟病鉴定, 一份采用人工接种结合在病区种植进行条纹叶枯病鉴定, 一份种植在水池用于白叶枯病接种鉴定, 一份种在水田考察农艺性状和测产。最终经 PCR 检测与抗病鉴定, 培育出 10 份聚合 3 种抗病基因的个体, 且其抗病程度均能稳定遗传且表达。

本研究通过有性杂交获得的聚合抗 3 种水稻病害基因的  $F_1$  植株, 因其 3 种抗病基因均呈现分离和自由组合, 所以在花药培养取样前, 先利用分子标记辅助选择技术淘汰不含目标基因的植株, 这样大大减少了花培群体的数量。

本研究结果表明, 通过花药培养与常规育种技术、分子标记辅助选择技术交叉进行, 达到完美结

合, 仅用了 2 ~ 3 年的时间, 不但快速实现了聚合多种抗病基因, 并且高效培育出抗多种病害的水稻新株系, 比常规育种可快 2 年以上, 既可提高育种速度, 又可缩短育种年限。

#### 3.2 PCR 检测与抗病鉴定的一致性

分子标记辅助选择技术, 虽然只要选择出合适的分子标记, 就可以准确地选择出目标植株, 但仍然会出现误选现象。*Xa23* 是一个来自普通野生稻的抗白叶枯病的全生育期抗性完全显性基因<sup>[15]</sup>; *Pi-1* 源于籼稻品种 AC23 中, 是一个具广谱抗性的显性抗稻瘟病基因<sup>[16]</sup>; *Stb-i* 是一个显性的全生育期高抗条纹叶枯病基因<sup>[17]</sup>。本研究利用与其紧密连锁的分子标记分别进行目的基因的 PCR 检测, 再通过田间抗病鉴定检测该基因的抗病表达水平。结果表明, 凡 PCR 检测 *Xa23*、*Stb-i* 基因呈阳性的株系, 其抗病鉴定表现为抗病 (R), 且抗病基因能稳定遗传, 抗病水平高效表达; PCR 检测 *Pi-1* 基因呈阳性的株系 14 株中有 4 个表现感病。推测其原因, 可能是由于不同基因的选择标记与目的基因的连锁程度不同, 连锁程度紧密的, 表现型与基因型一致性高, 连锁程度低的, 表现型与基因型的一致性就差。因此, 目的基因与选择标记的连锁程度对表现型辅助选择结果有重要影响, 应尽量选择连锁紧密的标记。本研究结果还表明: 在利用分子标记辅助选择基因型的同时, 仍然需要与传统的人工抗病鉴定的表现型结果相结合, 这样才能保证选择的准确率高。

#### 3.3 亲本材料的选择

正确选配杂交亲本是水稻花培育种能否育成新品种的重要前提条件。本研究中的 3 个亲本只有花育 409 是通过审定的水稻品种, BG152、R118 是稳定纯合的中间材料, 其产量与当前主栽品种比较分别减产 5.23%, 8.97%。通过花药培养与有性杂交、分子标记辅助选择相结合, 创造出的含 3 个抗病基因 *Xa23*、*Pi-1* 与 *Stb-i* 的花培聚合体后代在生育期、株高、穗数、穗粒数、结实率、单株谷质量等方面均表现有差异。虽然综合抗病性增加了, 但也只有作为抗源用于抗病育种中才能发挥其作用。因此, 要根据育种目标, 在了解品种资源材料的基础上, 正确选配亲本, 在注重抗病性的基础上, 同时注重丰产性、优质性与农艺性状的选择, 逐步累加、聚合和固定多种优良性状, 利于创造出的聚合体直接应用于生产中。

#### 3.4 花药培养中出现的问题及防治措施

虽然花药培养技术的操作过程并不复杂, 已趋于完善, 但常常出现褐化、白化苗及污染现象。

3.4.1 褐化现象 褐化现象<sup>[18]</sup>是指培养过程中向培养基中释放褐色物质,致使培养基和培养材料逐渐变褐而死亡的现象。本研究在花药培养过程中,产生的愈伤组织褐化率高达 30% 以上,推测其原因可能是花药过嫩或过老引起的。因此笔者建议:要适期取材,准确选择花粉发育适期的幼穗,并且取样后要经过幼穗低温处理,多数材料以 6~8℃ 低温处理 12 d 为宜。据研究发现处于单核靠边期的花粉是培养的最佳时期<sup>[19]</sup>,其具体判断标准是剑叶叶枕距下叶叶枕一般 5~7 cm 为宜;颖壳颜色呈浅绿色,大小接近成熟颖壳,硬度适中,既不老也不幼嫩;花丝加花药长度小于颖壳 1/2、大于 1/3 时,花粉发育大多处于单核靠边期;进行接种时,剪去过老和过嫩小穗。

3.4.2 白化苗现象 白化苗现象<sup>[20]</sup>是指试管幼苗整株或部分失绿的现象。本研究中,分化出苗共 1 148 丛,其中绿苗 766 丛,白苗 382 丛,白苗率为 33.3%。分析其原因可能是在光照培养过程中,出现了培养温度较高现象,导致愈伤组织增殖快、老化,从而促进了白化苗的形成。因此,在光照培养过程中,一定把培养温度控制在 25~27℃ 内。

3.4.3 污染现象 污染是指在培养过程中由于细菌、真菌等微生物的侵染,使培养基表面出现大量菌斑,使花药不能正常生长的现象<sup>[21]</sup>。本研究中,也出现了污染现象,其中细菌、真菌污染都有,且污染率达 18.6%,这主要是由于在操作过程中人为因素造成的。因此,花药接种必须在无菌的条件下进行,尤其是稻穗在田间取回时用 75% 酒精消毒后再作低温预处理;培养基、吸水纸以及试管要用高压灭菌锅灭菌 30 min;操作人员在接种前,要对操作室用紫外灯照射灭菌,对接种工具用酒精灯灼烧消毒,对工作台和操作人员的双手用酒精棉擦拭消毒。

致谢:中国农业科学院作物科学研究所周永力研究员、天津农学院王松文教授和天津市植物保护研究所杨秀荣副研究员分别无偿提供白叶枯病原菌和稻瘟病原菌,在抗病鉴定中给予指导;中国农业科学院作物科学研究所徐建龙研究员提供携带抗白叶枯病 *Xa23* 基因的粳型材料 BG152 和携带抗稻瘟病 *Pi-1* 基因的籼型材料 R118,在基因聚合中给予指导,特此致谢。

#### 参考文献:

- [1] 陈荣林,梁运波,刘亚. 水稻旱害及抗旱育种综述[J]. 中国农学通报,2005,21(6):220-222.
- [2] 李梅芳,周开达. 水稻生物技术育种[M]. 北京:中国农业科技出版社,2001.
- [3] 程式华. 杂交水稻育种材料和方法研究的现状及发展趋势[J]. 中国水稻科学,2000,14(3):165-169.
- [4] 孙国昌,杜新法,陶荣祥,等. 水稻稻瘟病防治研究进展和 21 世纪初研究设想[J]. 植物保护,2000,26(1):34-36.
- [5] 潘海军,王春连,赵开军,等. 水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 PCR 分子标记定位及辅助选择[J]. 作物学报,2003,29(4):501-507.
- [6] 李进斌,李鼎,孙一丁,等. 利用与抗稻瘟病基因 *Pi1* 连锁的 MRG4766 标记鉴定 173 份云南地方稻种[J]. 分子植物育种,2012(1):73-79.
- [7] 潘海军,王春连,赵开军,等. 水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 PCR 分子标记定位及辅助选择[J]. 作物学报,2003,29(4):501-507.
- [8] 于凤池,姚坚,姚海根,等. 花药培养与分子标记辅助选择相结合快速选育抗条纹叶枯病晚粳稻新品系的技术探讨[J]. 浙江农业科学,2010(4):838-840.
- [9] 章琦,赵炳宇,赵开军,等. 普通野生稻的抗水稻白叶枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 新基因 *Xa-23(t)* 的鉴定和分子标记定位[J]. 作物学报,2000,26(5):536-542.
- [10] 闵绍楷,申宗坦,熊振民,等. 水稻育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [11] 刘水芳,杨秀荣,孙淑琴,等. 水稻品种抗稻瘟病鉴定技术[J]. 天津农业科学,2007,13(4):55-58.
- [12] 罗楚平,倪磊,陈志谊,等. 水稻稻瘟病接种技术及 2009 年江苏省区试品种抗性鉴定[J]. 江苏农业科学,2009(6):178-179.
- [13] Washio O, Ezuka A, Sakuragi Y, et al. Studies on the breeding of rice varieties resistant to stripe disease: I. Varietal difference in resistance to stripe disease[J]. Jpn J Breeding, 1967,17(2):91-97.
- [14] 朱英国,杨代常. 光周期敏感不育水稻研究与利用[M]. 武汉:武汉大学出版社,1992.
- [15] Ribaut J M, Hoisington J. Marker-assisted selection: new tools and strategies[J]. Trends in Plant Science, 1998,3(6):236-239.
- [16] 张小红,王春连,李桂芬,等. 转 *Xa23* 基因水稻的白叶枯病抗性及其遗传分析[J]. 作物学报,2008,34(10):1679-1687.
- [17] Maeda H, Nemoto H, Yagi T, et al. QTL analysis for rice stripe disease resistance using recombinant inbred lines (RILs) derived from crossing between Milyang and Akihikari[M]. Beijing: China Agricultural Science Technology Press, 1999:53-57.
- [18] 潘瑞炽,施和平,李玲,等. 植物组织培养[M]. 2 版. 广州:广东高等教育出版社,2001.
- [19] 王敬驹,孙敬三,朱至清. 水稻花粉植株的诱导条件及影响诱导频率的某些因素[J]. 植物学报,1974(1):43-54.
- [20] 李梅芳,周开达. 水稻生物技术育种[M]. 北京:中国农业科技出版社,2001.
- [21] 潘瑞炽. 植物组织培养[M]. 2 版. 广州:广东高等教育出版社,2001.